昆虫的 RNA 干扰

杨　广[1], 尤民生[1,*], 赵伊英[2], 刘春辉[1]
(1. 福建农林大学应用生态研究所, 福州 350002; 2.石河子大学农学院, 新疆石河子 832000)

摘要: RNA 干扰(RNAi)是一种强有力的分子生物学技术, 在昆虫研究中得到了较多的应用。目前, RNAi 技术主要应用于昆虫功能基因和功能基因组研究, 已在多个目的 19 种昆虫上实现了 RNAi。在昆虫上实现 RNAi 的方法主要有注射、浸泡、喂食、转基因和病毒介导等方法, 这些方法各有特点, 其中喂食法因其简单而最有应用前景。昆虫 RNAi 的系统性较为复杂, 只有部分昆虫具有 RNAi 的系统性。昆虫中 RNAi 信号传导的基因可能是 *sid-1*, 但昆虫 RNAi 的系统性机理还不是很清楚。转基因植物产生的 dsRNA 实现了对作物的保护, 证实了 RNAi 技术可用于害虫控制, 为害虫控制开辟了新领域。昆虫的 RNAi 研究处在起步阶段, 研究昆虫 RNAi 的机理, 特别是 RNAi 在昆虫体内的系统性扩散机理, 改进实现 RNAi 的方法, 提高 RNAi 技术在昆虫研究中的应用, 有利于昆虫基因功能鉴定和害虫控制, 促进昆虫学科的发展。

关键词: 昆虫; RNA 干扰(RNAi); 功能基因; 基因沉默; 害虫控制
中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2009)10-1156-07

RNA interference in insects

YANG Guang[1], YOU Min-Sheng[1,*], ZHAO Yi-Ying[2], LIU Chun-Hui[1] (1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is a powerful molecular technique, and has been widely applied to researches on insects. The technique is largely employed to study functional genes and functional genomics, and so far has been applied in 19 species of several insect orders. There are several ways to obtain RNAi in insects, such as injection, soaking, feeding, developing transgenic organisms and virus mediation, of which feeding might be most applicable due to its simplicity in practice. Systemic RNAi has been observed only in some insects, and the RNAi signals were first considered to be transferred by *sid-1* gene in insects, but the mechanism has not been fully elucidated. Transgenic plants producing dsRNA have showed a significant protection of plants from pest damaging, suggesting that the RNAi technique can be applied as a new strategy for improving pest management. The study on RNAi in insects is currently in the very beginning phase, and further work needs to be done to address the mechanism of RNAi in insects, especially the mechanism of systemic RNAi. The approaches to RNAi are expected to be improved in favor of application of RNAi technique to the function identification of insect genes and the practical management of insect pests, aiming at boosting the development of entomology.

Key words: Insect; RNAi; functional gene; gene silencing; pest control

Guo 等(1995)在利用反义 RNA 技术研究秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的 *par1* 基因功能时, 发现了基因沉默的现象。Fire 等(1998)详细阐明了这种现象是由于在制备正义/反义 RNA 时混入了少量的双链 RNA (dsRNA)引起的, 即双链 RNA 触发的 RNA 沉默, 并称这种现象为 RNA 干扰(RNAi)。近十年来, 人们逐步地认识到 RNAi 在许多真核生物中是保守的, 其基本原理就是利用 dsRNA 介导的基因沉默(Hannon, 2002; Geley and Müller, 2004)。RNAi 作为一种强有力的分子生物学技术, 在昆虫研究中逐渐得到应用。本文综述了近年来在昆虫上进行的 RNAi 研究, 包括了将 RNAi

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600403, 30971925); 福建省自然科学基金重点项目(B0520003)
作者简介: 杨广, 1973 年生, 福建尤溪人, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫分子生物学和植物诱导抗虫性, E-mail: yxg@fjau.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: msyou@fjau.edu.cn
收稿日期 Received: 2009-05-22; 接受日期 Accepted: 2009-07-09

技术应用于昆虫功能基因和功能基因组研究、在昆虫上实现 RNAi 的方法、昆虫 RNAi 的系统性及其机理，以及 RNAi 在害虫控制中应用。希望有助于昆虫学界的同行了解昆虫 RNAi 的研究进展，为进一步探讨昆虫 RNAi 的机理，发展昆虫 RNAi 的方法，以及利用 RNAi 技术鉴定昆虫基因功能和为害虫控制提供新途径和新技术奠定基础。

1 应用 RNAi 技术研究昆虫功能基因

RNAi 技术是进行昆虫功能基因研究的一个强有力的工具，最早应用于模式昆虫黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*。果蝇的 RNAi 研究为开发昆虫的 RNAi 技术和揭示昆虫的 RNAi 机理打下了很好的基础。果蝇 RNAi 的研究论文大约占了昆虫 RNAi 研究论文的一半，有关这方面的研究进展及动态将另文综述。RNAi 技术已被应用于完全变态和不完全变态昆虫基因功能的研究（杨中侠等，2008）。表 1 详细列出了除果蝇外其他昆虫功能基因的 RNAi 研究概况，包括了鳞翅目昆虫 7 种、鞘翅目 3 种、直翅目 3 种、膜翅目 2 种、同翅目 1 种、双翅目 1 种、等翅目 1 种。

RNAi 技术不仅可应用于单个基因的功能鉴定，还可以进行基因组的功能分析。但是到目前为止，除了果蝇外其他昆虫上应用 RNAi 技术进行功能基因组的研究还比较少。根据编码必需蛋白的基因是 RNAi 导致死亡的最好靶标的原则，从玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte 的 cDNA 文库中筛选出 290 个候选靶标基因，评价这些基因 RNAi 对玉米根萤叶甲的毒性，结果表明最有效的是液泡 ATP 酶基因（*V-ATP*）（Baum *et al.*, 2007）。RNAi 技术是研究昆虫功能基因组的有力工具，今后这方面的研究将会越来越多。

2 昆虫 RNAi 的方法

昆虫 RNAi 的方法主要有注射、浸泡、喂食、转基因和病毒介导等方法。选择一种合适的昆虫 dsRNA 导入方法是昆虫 RNAi 的主要技术关键。

2.1 注射

在绝大多数昆虫 RNAi 研究中，首选的输入方法是将体外合成的微量的长 dsRNA 显微注射到昆虫体腔内（Dzitoyeva *et al.*, 2001）。与长 dsRNA 相比，短 dsRNA（22 个核苷酸）的 RNAi 效果也相当（Boutla *et al.*, 2001）。另外，dsRNA 的 5′端的基团也影响到 RNAi 的效果，5′端磷酸化比羟基末端的基因沉默效果更好（Boutla *et al.*, 2001）。

注射 dsRNA 到昆虫中以抑制基因表达，这种方法的主要优点是效率高，但也有一些缺点。首先，要体外合成及保存 dsRNA，相对成本高，步骤较为繁琐。此外，注射压力和伴随伤口不可避免地影响到昆虫，如表皮损伤激发了免疫反应，这样研究昆虫免疫时就不适宜用注射方式沉默基因。

2.2 浸泡

将果蝇胚胎浸泡在 dsRNA 溶液中，可以抑制基因表达，其效果与注射法相当，只是需要更高的 dsRNA 浓度（Eaton *et al.*, 2002）。将果蝇 S2 细胞浸泡于细胞循环基因 *CycE* 和 *ago* 的 dsRNA 溶液，可以有效抑制基因的表达，从而提高蛋白的合成（March and Bentley, 2007）。浸泡法适用于那些容易从溶液中吸收 dsRNA 的特殊昆虫细胞组织和昆虫特定发育阶段，所以应用得较少。

2.3 喂食

喂食 dsRNA 在绝大多数情况下可能是最诱人的方法，这主要是因为操作简单方便，容易实现。同时也由于喂食 dsRNA 是自然的输入方式，对昆虫造成的侵害性小，不影响其他基因的表达。但在早期昆虫喂食 dsRNA 的研究却是令人沮丧的，如注射 dsRNA 能成功地沉默棉贪夜蛾 *Spodoptera littoralis* 中肠表达的氨基肽酶基因 *slapn*，而通过喂食 dsRNA 却不能实现 RNAi（Rajagopal *et al.*, 2002）。可喜的是，已有研究显示喂食 dsRNA 在许多昆虫上取得成功。喂食苹浅褐卷蛾 *Epiphyas postvittana* 幼虫的 dsRNA，可以抑制幼虫中肠的羧酸酯酶基因 *EposCXE1* 的表达，还可以抑制成虫触角上的信息素结合蛋白 *EposPBP1* 基因表达（Turner *et al.*, 2006）。喂食 dsRNA 可以抑制长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 唾液 nitrophorin 2 基因 *NP2* 的表达，导致了血浆凝结时间的缩短（Araujo *et al.*, 2006）。喂食 dsRNA 还在其他在许多昆虫中取得成功，包括了半翅目、鞘翅目和鳞翅目昆虫（Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007）。

另外，还有一种比直接喂食 dsRNA 更好的喂食方法，就是利用转基因植株产生 dsRNA 作为昆虫的食物实现 RNAi（Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007）。这种方法的 RNAi 好处在于保证持续和稳定的 dsRNA。也有人尝试用产生 dsRNA 的酵母工程菌喂食果蝇，没有取得成功（Gura, 2000）。不过细菌产生的 dsRNA 对线虫是有效的（Timmons and Fire, 1998），因而细菌（特别是杀虫细菌）产生的 dsRNA 对昆虫的 RNAi 值得进一步研究。

表1 昆虫功能基因的RNAi研究(果蝇除外)

Table 1 Studies on insect gene function by RNAi (excluding *Drosophila*)

昆虫 Insects	基因 Genes	方法 Ways	效果 Effects	文献 References
家蚕 *Bombyx mori*	生物钟基因 *per*	转基因	卵孵化节律失调	Sandrelli *et al*., 2007
	蜕皮起动激素基因 *ETH*	转基因	导致了家蚕在2龄蜕皮时死亡	Dai *et al*., 2008
埃及棉斜纹夜蛾 *Spodoptera littoralis*	肌动蛋白基因 *β-actin*	注射	妨碍精子释放	Gvakharia *et al*., 2003
苹浅褐卷蛾 *Epiphyas postvittana*	羧酸酯酶基因 *EposCXE1* 和 信息素结合蛋白基因 *EposPBP1*	喂食	抑制基因表达	Turner *et al*., 2006
棉铃虫 *Helicoverpa armigera*	细胞色素P450基因 *CYP6AE14*	喂食	幼虫生长受阻碍	Mao *et al*., 2007
	谷胱甘肽-S-转移酶基因 *GST1*	喂食	成功抑制基因表达	
甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*	几丁质合成酶基因	注射	昆虫表皮组织混乱,幼虫气管的 上表皮细胞不扩张,并导致畸形	Chen *et al*., 2008
棉贪夜蛾 *Spodoptera littoralis*	生物钟基因 *per*	注射	延迟精子的释放	Kotwica *et al*., 2009
松墨天牛 *Monochamus alternatus*	虫漆酶基因 *MaLac2*	注射	导致蛹和成虫表皮硬化,甚至死亡	Niu *et al*., 2008
赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	几丁质合成酶基因 *TcCHS1* 和 *TcCHS2*	注射	分别影响幼虫到幼虫、幼虫到蛹和蛹到 成虫的蜕皮;导致了幼虫停止取食, 幼虫变小,中肠几丁质含量下降	Arakane *et al*., 2005
	几丁质酶基因 *TcCHT5*, *TcCHT10*, *TcCHT*, *TcIDGF4*	注射	分别影响蛹到成虫蜕皮;影响卵孵化, 幼虫蜕皮,化蛹和成虫变形;影响蛹的 腹部收缩,翅/翅基延伸;影响成虫羽化	Zhu *et al*., 2008
玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera* *virgifera LeConte*	液泡ATP酶基因 *V-ATP*	喂食	幼虫发育延缓和死亡增加	Baum *et al*., 2007
黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata*	精氨酸激酶基因 *AK*	喂食	延缓发育,提高死亡率和降低繁殖力	Zhao *et al*., 2008
黄斑黑蟋蟀 *Gryllus bimaculatus*	生物钟基因 *per*	注射	视神经叶永久性失去动作 节律和电节律的功能	Moriyama *et al*., 2008
	一氧化氮合成酶基因 *NOS*	注射	损害蟋蟀的长期记忆	Takahashi *et al*., 2009
德国小蠊 *Blattella germanica*	*BgRXR* 基因	注射	蛹不能羽化	Martin *et al*., 2006
	色素扩散因子基因 *pdf*	注射	影响昆虫夜间的活动的特性	Lee *et al*., 2009
南美沙漠蝗 *Schistocerca americana*	眼睛颜色基因 *vermilion*	注射	抑制眼色素的形成,并系统性表达	Dong and Friedrich, 2005
菜叶蜂 *Athalia rosae*	*Ar white* 基因	注射	胚胎眼睛色素的白色的拟表型	Sumitani *et al*., 2005
意大利蜜蜂 *Apis mellifera*	转录因子基因 *Relish*	注射	抑制了该基因表达,并进一步降低了另两 个免疫基因 *abaecin* 和 *hymenoptaecin* 的表达	Schlüns and Crozier, 2007
长红猎蝽 *Rhodnius prolixus*	唾液 nitrophorin 2 基因 *NP2*	注射 喂食	缩短血浆凝结时间	Araujo *et al*., 2006
刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans*	*TsetseEP* 基因和铁传 递蛋白基因 *2A192*	喂食	抑制 *TsetseEP* 基因表达; 不能抑制 *2A192* 基因表达	Walshe *et al*., 2009
黄肢散白蚁 *Reticulitermes flavipes*	纤维素酶基因 *Cell-1* 和等级调 控六聚体存贮蛋白基因 *Hex-2*	喂食	降低了群体适合度和提高了死亡率	Zhou *et al*., 2008

但是不同昆虫物种对口腔传输的 RNAi 的敏感性是不同，昆虫中肠上皮细胞摄入 dsRNA 的障碍是影响通过喂食 dsRNA 沉默昆虫基因的关键因素（Walshe *et al*., 2009）。同一种昆虫的不同基因对口腔传输的 RNAi 的敏感性也不同，如喂食刺舌蝇 *Glossina morsitans morsitans* dsRNA，可以有效地抑制中肠表达 *TsetseEP*，但是不能抑制脂肪体表达铁传递蛋白基因 *2A192*（Walshe *et al*., 2009）。是不是所有昆虫中肠表达基因都能够通过喂食 dsRNA 的方法来抑制？喂食 dsRNA 的方法能否抑制中肠以外表达的基因？其中的机理是什么？这些问题还需要更多的研究。

2.4　转基因

转基因法进行 RNAi 的优点在于可持续、稳定和便利地得到 dsRNA，并且能够遗传。转基因方法首先被应用于果蝇上，应用 GAL4/UAS 转基因技术系统，得到能够稳定表达 RNA 发夹结构的转基因个体（Kennerdell and Carthew, 2000；Tavernarakis *et al*., 2000）。随后，利用转座技术产生表达 dsRNA 的转基因埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（Travanty *et al*., 2004），用 U6 启动子在果蝇的 S2 细胞生成短发夹 RNA（shRNA）来抑制基因表达（Wakiyama *et al*., 2005）；利用 *piggy*Bac 质粒把生物钟基因 *per* 的 RNAi 元件转化到家蚕 *Bombyx mori* 胚胎获得基因沉默的转基因个体（Sandrelli *et al*., 2007）；以及利用转染技术沉默果蝇线粒体铁陪伴蛋白 frataxin 基因 *dfh*，产生个体大的龄期长的幼虫和寿命短的成虫（Anderson *et al*., 2005）。GAL4/UAS 转基因技术系统还被应用于家蚕（Dai *et al*., 2008），这种方法得到的转基因生物，其 RNAi 可被诱导表达，这样就可研究基因在某一时间段的功能，而且使得对有关昆虫成虫发育、生理和神经系统功能基因的研究变得可行。

2.5　病毒介导

病毒介导的 RNAi 方法就是利用病毒侵染后在寄主体内复制时形成双链 RNA 的原理，获得目标基因的 dsRNA。已有报道将重组 Sindbis 病毒电转化到家蚕细胞中，产生的 dsRNA 抑制 *BR-C* 基因的表达，导致幼虫不能化蛹或者成虫形态缺陷（Uhlirova *et al*., 2003）。病毒介导的 RNAi 的研究还少，但这种方法利用病毒的侵染和复制能力，不产生转基因昆虫，比转基因方法可减少转基因昆虫组织或个体的筛选和培育过程，具有独特的优势。

3　昆虫 RNAi 的系统性及其机理

昆虫的 RNAi 效果如何，很重要的一点就是 RNAi 信号在昆虫体内的传播，也就是 RNAi 的系统性。植物、秀丽小杆线虫 *C. elegans* 和三角涡虫 *Schmidtea mediterranea* 中，RNAi 是系统性的，这是由于 RNAi 信号通过细胞之间的扩散而达到生物体的整个系统（Fire *et al*., 1998；Newmark *et al*., 2003）。而昆虫的 RNAi 似乎没有系统性，如果蝇细胞能够摄入 dsRNA，但是不能全身性传递信号（Saleh *et al*., 2006）。

研究表明，不同昆虫中 RNAi 信号传导能力不同，其系统性反应也就不一样。果蝇细胞摄入 dsRNA 引起局部的基因沉默，RNAi 信号不能系统性传导（Van Roessel *et al*., 2002；Roignant *et al*., 2003；Dietzl *et al*., 2007）。拟谷盗 *Tribolium*（Tomoyasu *et al*., 2008）和南美沙漠蝗 *Schistocerca Americana*（Dong and Friedrich, 2005）都有很强的系统性 RNAi 反应。线虫系统性传导 RNAi 信号的基因是 *sid-1*（Winston *et al*., 2002）。相对应地，果蝇上没有发现 *sid-1* 基因，蝗虫中有一个 *sid-1* 的直系同源基因（Dong and Friedrich, 2005），拟谷盗 *Tribolium* 上也有 *sid-1* 类基因（Tomoyasu *et al*., 2008）。昆虫上传导 RNAi 信号的基因可能也是 *sid-1*。在 NCBI 上进一步进行 BLAST 搜寻，发现在 1 种鞘翅目昆虫，1 种鳞翅目昆虫，2 种膜翅目昆虫，3 种半翅目昆虫中找到 *sid-1* 同源基因，但是在同翅目中没找到同源基因（Walshe *et al*., 2009）。

然而，进一步的研究发现拟谷盗 *Tribolium* 和秀丽小杆线虫 *C. elegans* 的 RNAi 机制不一样。拟谷盗 *Tribolium* 没有秀丽小杆线虫 *C. elegans* RNAi 需要的一些关键因子，如依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase, RdRP）和 RNA 通道转运子（RNA channel transporter, SID）等（Fire *et al*., 1998；Winston *et al*., 2002），且拟谷盗 *Tribolium* 上的 *sid-1* 类基因的功能不是吸收 dsRNA，而是与秀丽小杆线虫 *C. elegans* 的 *tag-130* 基因相似（Tomoyasu *et al*., 2008）。因此，*sid-1* 基因在昆虫 RNAi 中起到的具体功能还需进一步确认。最近的研究表明，在果蝇中抗病毒的 RNAi 反应是依赖于病毒特异性的免疫信号的系统传导（Saleh *et al*., 2009）。昆虫系统性 RNAi 及其参与基因还有待进一步研究，理解和揭示昆虫 RNAi 在昆虫体内系统

性传导的分子机制有助于把 RNA 干扰技术应用于害虫防治。

4 利用 RNAi 技术控制害虫

RNAi 主要用来研究昆虫的功能基因，对利用 RNAi 技术控制害虫的研究还比较少。通过注射和喂食 dsRNA 试验研究昆虫的功能基因，发现一些基因的沉默对昆虫的生长发育有显著的影响。因此，利用 RNAi 效应来抑制昆虫中必需基因的功能进而导致其死亡，以保护植物免受害虫的为害，这在理论上是可行的，而且已经通过转基因植株产生的 dsRNA 来控制害虫得到了证实。表达液泡 ATP 酶基因 *V-ATP* 的 dsRNA 的转基因玉米可以显著减少玉米根萤叶甲的为害，对玉米有显著的保护作用(Baum *et al.*, 2007)。将棉铃虫中与棉酚解毒代谢直接相关 *CYP6AE14* 基因的 RNAi 元件转到拟南芥和烟草上产生 dsRNA，使得取食转基因植物的棉铃虫 *CYP6AE14* 基因表达受到抑制，从而提高棉酚对棉铃虫的毒性(Mao *et al.*, 2007)。

转基因植物产生的 dsRNA，对取食它的昆虫产生 RNAi 效应，导致昆虫的死亡，使 RNAi 技术在害虫控制中的应用变得切实可行。但是，目前只对少数几种昆虫进行了探索，这种技术能否扩展到其他昆虫，实验室内的成功能否转为有效的田间害虫控制，以及这种方法的长期效应等都需要通过进一步的研究和分析。然而，RNAi 技术在害虫控制中的理论和应用研究，将有可能开创害虫控制的新纪元。

5 结语

RNAi 技术在昆虫功能基因研究中获得大量应用，有助于鉴定昆虫基因的功能。发展高通量的 RNAi 技术，可极大地促进昆虫功能基因组的研究。昆虫 RNAi 的实现方法中，喂食法具有独特的优点，特别是产生 dsRNA 的转基因植物在害虫控制中有应用前景。另外，构建表达 dsRNA 的昆虫病原微生物也很有意义。

已有的研究还不足以证明所有昆虫都能实现 RNAi 在体内的系统性扩散，以及哪些昆虫具有 RNAi 的系统性。如果 *sid-1* 不是昆虫 RNAi 的信号传导基因，那么昆虫 RNAi 系统性的机理是什么？不同种昆虫的 RNAi 系统性的机理是否相同？这些问题都有待进一步研究。

RNAi 技术在害虫控制中的应用无疑具有广阔的应用前景，目前的研究还停留在实验室阶段，相信这方面的研究会突飞猛进，为害虫控制提供新的途径和方法。

参 考 文 献 (References)

Anderson PR, Kirby K, Hilliker AJ, Phillips JP, 2005. RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.*, 14(22): 3 397 – 3 405.

Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, Kanost M, Beeman RW, 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 453 – 463.

Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH, 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(9): 683 – 693.

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1 322 – 1 326.

Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, Tsagris M, Tabler M, 2001. Short 5′-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 11(22): 1 776 – 1 780.

Chen X, Tian H, Zou L, Tang B, Hu J, Zhang W, 2008. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bulletin of Entomological Research*, 98(6): 613 – 619.

Dai H, Ma L, Wang J, Jiang R, Wang Z, Fei J, 2008. Knockdown of ecdysis-triggering hormone gene with a binary UAS/GAL4 RNA interference system leads to lethal ecdysis deficiency in silkworm. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(9): 790 – 795.

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ, 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448 (7 150): 151 – 156.

Dong Y, Friedrich M, 2005. Nymphal RNAi: Systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnol.*, 5: 25 – 32.

Dzitoyeva S, Dimitrijevic N, Manev H, 2001. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Mol. Psychiatry*, 6 (6): 665 – 670.

Eaton BA, Fetter RD, Davis GW, 2002. Dynactin is necessary for synapse stabilization. *Neuron*, 34(5): 729 – 741.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded

RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6 669): 806 – 811.

Geley S, Müller C, 2004. RNAi: Ancient mechanism with a promising future. *Exp. Gerontol.*, 39(7): 985 – 998.

Gura T, 2000. A silence that speaks volumes. *Nature*, 404(6 780): 804 – 808.

Guo S, Kemphues KJ, 1995. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4): 611 – 620.

Gvakharia BO, Bebas P, Cymborowski B, Giebultowicz JM, 2003. Disruption of sperm release from insect testes by cytochalasin and beta-actin mRNA mediated interference. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60(8): 1 744 – 1 751.

Hannon GJ, 2002. RNA interference. *Nature*, 418(6 894): 244 – 251.

Kennerdell JR, Carthew RW, 2000. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotechnology*, 18(8): 896 – 898.

Kotwica J, Bebas P, Gvakharia BO, Giebultowicz JM, 2009. RNA interference of the period gene affects the rhythm of sperm release in moths. *J. Biol. Rhythms*, 24(1): 25 – 34.

Lee CM, Su MT, Lee HJ, 2009. Pigment dispersing factor: an output regulator of the circadian clock in the German cockroach. *J. Biol. Rhythms*, 24(1): 35 – 43.

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1 307 – 1 313.

March JC, Bentley WE, 2007. RNAi-based tuning of cell cycling in *Drosophila* S2 cells: Effects on recombinant protein yield. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73(5): 1 128 – 1 135.

Martin D, Maestro O, Cruz J, Mane-Padros D, Belles X, 2006. RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *J. Insect Physiol.*, 52(4): 410 – 416.

Moriyama Y, Sakamoto T, Karpova SG, Matsumoto A, Noji S, Tomioka K, 2008. RNA interference of the clock gene period disrupts circadian rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Biol. Rhythms*, 23(4): 308 – 318.

Newmark PA, Reddien PW, Cebria F, Alvarado AS, 2003. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(Suppl. 1): 11 861 – 11 865.

Niu BL, Shen WF, Liu Y, Weng HB, He LH, Mu JJ, Wu ZL, Jiang P, Tao YZ, Meng ZQ, 2008. Cloning and RNAi-mediated functional characterization of *MaLac2* of the pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *Insect Mol. Biol.*, 17(3): 303 – 312.

Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.*, 277(49): 46 849 – 46 851.

Roignant JY, Carre C, Mugat B, Szymczak D, Lepesant JA, Antoniewski C, 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, 9(3): 299 – 308.

Saleh MC, Tassetto M, van Rij RP, Goic B, Gausson V, Berry B, Jacquier C, Antoniewski C, Andino R, 2009. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 458(7 236): 346 – 350.

Saleh MC, van Rij RP, Hekele A, Gillis A, Foley E, O'Farrell PH, Andino R, 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8: 793 – 802.

Sandrelli F, Cappellozza S, Benna C, Saviane A, Mastella A, Mazzotta GM, Moreau S, Pegoraro M, Piccin A, Zordan MA, Cappellozza L, Kyriacou CP, Costa R, 2007. Phenotypic effects induced by knock-down of the period clock gene in *Bombyx mori*. *Genet. Res.*, 89(2): 73 – 84.

Schlüns H, Crozier RH, 2007. Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Mol. Biol.*, 16(6): 753 – 759.

Sumitani M, Yamamoto DS, Lee JM, Hatakeyama M, 2005. Isolation of white gene orthologue of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) and its functional analysis using RNA interference. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(3): 231 – 240.

Takahashi T, Hamada A, Miyawaki K, Matsumoto Y, Mito T, Noji S, Mizunami M, 2009. Systemic RNA interference for the study of learning and memory in an insect. *Journal of Neuroscience Methods*, 179(1): 9 – 15.

Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M, 2000. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genetics*, 24(2): 180 – 183.

Timmons L, Fire A, 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6 705): 854.

Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G, 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, 9(1): R10.1 – R10.22.

Travanty EA, Adelman ZN, Franz AWE, Keene KM, Beaty BJ, Blair CD, James AA, Olson KE, 2004. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 607 – 613.

Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD, 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.*, 15(3): 383 – 391.

Uhlirova M, Foy BD, Beaty BJ, Olson KE, Riddiford LM, Jindra M, 2003. Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26): 15 607 – 15 612.

Van Roessel P, Hayward NM, Barros CS, Brand AH, 2002. Two-color GFP imaging demonstrates cell-autonomy of GAL4-driven RNA interference in *Drosophila*. *Genesis*, 34(1 – 2): 170 – 173.

Wakiyama M, Matsumoto T, Yokoyama S, 2005. *Drosophila* U6 promoter-driven short hairpin RNAs effectively induce RNA

interference in Schneider 2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331(4): 1 163 – 1 170.

Walshe DP, Lehane SM, Lehane MJ, Haines LR, 2009. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Mol. Biol.*, 18(1): 11 – 19.

Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP, 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5 564): 2 456 – 2 459.

Yang ZX, Wen LZ, Wu QJ, Wang SL, Xu BY, Zhang YJ, 2008. Application of RNA interference in studying gene functions in insects. *Acta Entomologia Sinica*, 51(10): 1 077 – 1 082. [杨中侠, 文礼章, 吴青君, 王少丽, 徐宝云, 张友军, 2008. RNAi 技术在昆虫功能基因研究中的应用进展. 昆虫学报, 51(10): 1 077 – 1 082]

Zhao Y, Yang G, Wang-Pruski G, You M, 2008. *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae): Arginine kinase cloning and RNAi-based pest control. *European Journal of Entomology*, 105(5): 815 – 812.

Zhou X, Wheeler MM, Oi FM, Scharf ME, 2008. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(8): 805 – 815.

Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S, 2008. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18): 6 650 – 6 655.

(责任编辑: 赵利辉)